

Inês Hespanhol Pinto

Regeneração Periodontal de defeitos intra-ósseos com células estaminais de origem dentária

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2019

Inês Hespanhol Pinto

**Regeneração Periodontal de defeitos intra-ósseos com células estaminais de origem
dentária**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2019

Inês Hespanhol Pinto

**Regeneração Periodontal de defeitos intra-ósseos com células estaminais de origem
dentária**

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Dentária

RESUMO

Objetivo: Avaliar a eficácia da utilização de células estaminais de origem dentária na regeneração de defeitos periodontais intra-ósseos.

Materiais e métodos: A pesquisa, na base de dados da PubMed, restringiu-se a artigos em português e inglês, sem limites temporais. Incluíram-se revisões sistemáticas, meta-análises e ensaios clínicos em animais e humanos. A estratégia de pesquisa resultou em 8 artigos.

Resultados: A escassa literatura disponível defende que a utilização de células estaminais de origem dentária parece promissora e segura. Os resultados são, numa perspetiva geral, positivos, verificando-se ganho de inserção clínico, aumento de volume gengival, mineralização óssea e melhoria dos sinais clínicos.

Conclusões: São necessários mais estudos para validar os achados e aferir (ou refutar) uma eficácia superior das técnicas que usam células estaminais na regeneração de defeitos intraósseos, em detrimento de outras.

Palavras chaves: “stem cells”, “intraony defects”, “bone regeneration”, “periodontal disease”

ABSTRACT

Objective: To evaluate the efficiency of the use of stem cells of dental origin in the regeneration of intraosseous periodontal defects.

Materials and methods: The survey, in the PubMed database, was restricted to articles in Portuguese and English, with no time limits. Systematic reviews, meta-analyses and clinical trials in animals and humans were included. The search strategy resulted in 8 articles.

Results: The scarce available literature argues that the use of stem cells of dental origin seems promising and safe. The results are, from a general perspective, positive, with clinical insertion gain, gingival volume increase, bone mineralization and improvement of clinical signs.

Conclusions: More studies will be needed to validate the findings and to gauge (or refute) superior efficacy of stem cell techniques in regenerating intraosseous defects, to the detriment of others.

Key words: *"stem cells", "intraosseous defects", "bone regeneration", "periodontal disease"*

DEDICATÓRIAS

Aos meus Pais, Alberto e Isabel, e à minha Irmã, Jotinha. As minhas pessoas. Se existe amor de verdade, é este que tenho por vós.

Obrigada Pai e Mãe, por sempre acreditarem em mim, sem o vosso apoio, nenhum dos meus sonhos seria possível.

São a minha casa, independentemente de onde eu esteja.

Espero um dia ser metade das pessoas que vocês são.

AGRADECIMENTOS

Primeiro, gostava de agradecer à minha família, pelo apoio, pelo amor, por tudo o que me ensinam. Obrigada Pai e Mãe por tudo o que fazem por mim, por todos os sacrifícios. Obrigada Pai por todos os ensinamentos, pela paciência e pelo carinho que tens por mim! Obrigada mãe por me ensinares a ser forte, por estares sempre pronta a ajudar e a resolver qualquer coisa, mas também pelo carinho! Obrigada Jotinha! Por seres a melhor irmã que podia pedir, a minha melhor amiga, a pessoa que sabe e guarda todos os meus segredos, a pessoa que me faz rir em qualquer momento, que me ajuda sempre e nunca se esquece de mim! Obrigada avós por me acompanharem e deixarem um bocadinho das vossas personalidades em mim. À avó Antónia por me ter passado a sua alegria e positividade! À avó Clara pela calma e altruísmo. Ao avô Guilherme e à sua descontração perante a vida, obrigada avô pelos momentos engraçados, piadas repetidas vezes e vezes sem conta que me fazem rir sempre que me recordo de ti. Ao avô Fernando pela sua vontade de ser melhor e nunca desistir.

Em seguida, devo agradecer aos meus colegas, ao melhor grupo que a universidade me deu, Leonor, Tavares, Pedro Vieira e Borba e ao melhor binómio que podia arranjar, Manuel Ramos.

A todos os meus amigos, que mesmo longe, estiveram presentes durante o meu percurso.

Quero agradecer também à minha orientadora, Patrícia Almeida Santos, pela sua disponibilidade, apoio e pelo exemplo que é para mim!

Por fim, ao Pietro, meu namorado, que nos últimos meses me acompanhou, e me ensinou a ser mais forte, que tornou a minha vida mais divertida e mais simples. Obrigada pelo carinho, amor e paciência. Obrigada por estares sempre pronto a ajudar, mesmo quando não percebes nada do assunto!

ÍNDICE

Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Dedicatórias.....	VII
Agradecimentos.....	VIII
Índice de abreviaturas.....	X
I. Introdução.....	1
I.1 Materiais e métodos.....	2
II. Resultados.....	3
III. Discussão.....	12
IV. Conclusão.....	15
V. Bibliografia.....	16
VI. Anexos.....	18
VI.1 Tabela 1: Estudos em animais.....	18
VI.2 Tabela 2: Estudos em Humanos.....	22

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

β-TCP: β- fosfato tricálcico

CEDD: células estaminais de dentes decíduos

CEDTPI: células estaminais dentárias de tecido pulpar inflamado

CELP: células estaminais do ligamento periodontal

CEM: células estaminais mesenquimatosas

CEM-LP: células estaminais mesenquimatosas derivadas do ligamento periodontal

CEM-MO: células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea

CEPD: células estaminais da polpa dentária

EC: esponja de colagénio

LP: ligamento periodontal

NIC: nível de inserção clínico

PGA: matriz de ácido poligénico

PS: profundidade de sondagem

RG: recessão gengival

RTG: regeneração tecidular guiada

SAI-PRT: técnica de intervenção celular na regeneração periodontal

TCMI: técnica cirúrgica minimamente invasiva

I. INTRODUÇÃO

O periodonto é um órgão complexo que abrange 4 tecidos mesenquimatosos, o cemento radicular, o osso alveolar, a gengiva e o ligamento periodontal, que funcionam como uma unidade única, providenciando ao dente a capacidade de resistir a cargas mastigatórias e possibilitando a sua ligação ao alvéolo circundante. Ainda que o periodonto seja capaz de resistir a cargas mastigatórias substanciais é, contudo, suscetível a danos mecânicos, químicos e bacterianos, sempre que estes ultrapassam a resistência dos tecidos (Gaubys *et al.*, 2018).

A periodontite é descrita na literatura como uma doença inflamatória crônica e multifatorial, fortemente associada à presença de um biofilme microbiano, num hospedeiro suscetível. Sabendo que se trata de uma doença responsável por alterações patológicas nos tecidos de suporte dentários, como o ligamento periodontal e o osso alveolar, através da formação de bolsas periodontais e de recessão gengival, deixar que esta doença progrida pode levar à perda dentária, bem como à perda da arquitetura óssea (Khorsand *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). Nesse sentido, os objetivos das diferentes modalidades ou terapias periodontais disponíveis visam a cessação da progressão da doença e, idealmente, a regeneração dos tecidos periodontais danificados ou perdidos, através da promoção da formação de novo osso alveolar, de novo cemento e de novo ligamento periodontal (Gaubys *et al.*, 2018). Com vista à tão desejada regeneração periodontal, vários são os materiais e as técnicas que têm sido desenvolvidos ao longo das últimas décadas (Heden e Wennström, 2006). De uma forma geral, podem ser divididos em técnicas de fundamento mecânico como a aplicação de membranas (Regeneração tecidual guiada - RTG) ou o preenchimento da lesão por enxertos (geralmente de tecido ósseo ou seu derivado); e as técnicas de fundamento biológico, como a aplicação de fatores de crescimento (como o derivado das plaquetas – PDGF; ou as proteínas morfogenéticas do osso – BMP), de proteínas de adesão (como a fibronectina), de proteínas da matriz extracelular (proteínas da matriz do esmalte), a engenharia tecidual com células vivas, a terapia genética e/ou uma combinação de métodos (Baptista, 2005).

No campo das terapias regenerativas, a citoterapia tem vindo a ganhar particular interesse nos últimos anos. A utilização de células estaminais autólogas constitui uma abordagem sedutora aos olhos dos cientistas e investigadores, pelas capacidades regenerativas, de renovação e de diferenciação em múltiplas linhagens celulares. As células estaminais mesenquimatosas (CEM) são células adultas, com capacidade de se especializarem em outros tipos celulares. Dadas estas singularidades, acredita-se na capacidade das CEM, quando utilizadas para

corrigir defeitos tecidulares, de estimular a neovascularização e levar a uma regeneração tecidular mais rápida. Além disso, devido às suas funções imuno-moduladoras, estas células podem dificultar, e até findar, o desenvolvimento da lesão tecidular, ao mesmo tempo permitindo que ocorram processos regenerativos (Gaubys *et al.*, 2018; Khorsand *et al.*, 2013).

A vasta distribuição destas células em tecidos adultos, nomeadamente nos de origem dentária, como a dentina e a polpa, faz delas um alvo de particular interesse na regeneração periodontal, seja pelo fácil acesso ou pela menor morbilidade que as técnicas de recolha podem provocar. Para testar esta abordagem regenerativa nos tecidos periodontais, estas células estaminais, colhidas de diferentes tecidos, têm sido investigadas em estudos pré-clínicos animais. Neste contexto, o ligamento periodontal (LP) aparece como um dos tecidos mais promissores, ao ser dotado de populações celulares progenitoras capazes de guarnecer múltiplas linhagens (Gaubys *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2013). Numa tentativa de encontrar a melhor opção, vários tipos de células, para além das do LP, como por exemplo as do tecido adiposo e do periósteo alveolar, têm sido usadas como forma de tratamento regenerativo. Recentemente, surgiu a hipótese de se usarem células inflamatórias de polpas dentárias provenientes de dentes com lesões endodônticas e com indicação de tratamento endodôntico não cirúrgico. Ao ter sido descoberta uma proporção de CEM significativa capaz de trazer algum potencial regenerativo, estes dentes poderão servir como fonte de material celular, reduzindo os riscos inerentes ao procedimento de colheita, como a lesão de polpas dentárias em dentes íntegros e saudáveis. Por outro lado, a utilização de células inflamatórias de polpas dentárias evita a realização de procedimentos adicionais e traumáticos como a extração de dentes, mesmo que sem uso em boca (Gaubys *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016). Neste contexto, o objetivo deste trabalho é compreender de que forma a utilização de células estaminais de origem dentária pode ser vantajosa na regeneração de defeitos periodontais intra-ósseos.

I.1. Materiais e métodos

Foi realizada uma pesquisa no motor de busca PubMed entre outubro de 2018 e abril de 2019. Utilizaram-se as seguintes palavras e expressões-chave: “*stem cells*”, “*intrabony defects*”, “*bone regeneration*”, “*periodontal disease*”. A pesquisa restringiu-se a artigos disponíveis em português e inglês, não tendo sido empregues quaisquer limites temporais. Foram incluídas revisões sistemáticas, meta-análises e ensaios clínicos em animais e humanos. A pesquisa resultou num total de 22 artigos. Depois de eliminados 3 trabalhos em duplicado e após a leitura na íntegra dos restantes, foram selecionados 8 artigos, que descreveremos em seguida.

II. RESULTADOS

Com o objetivo de avaliar a eficácia da utilização de células estaminais na regeneração de defeitos periodontais intra-ósseos, a estratégia de pesquisa anteriormente descrita resultou num total de 8 artigos: uma revisão sistemática e meta-análise, uma revisão sistemática, três ensaios clínicos randomizados, dois estudos experimentais e um relato de caso, que analisaremos de seguida. Os resultados são apresentados por ordem cronológica e divididos em estudos animais e estudos em humanos, por nos parecer mais conveniente.

Estudos em animais (ver tabela 1, anexo 1)

Khorsand *et al.*, em **2013**, publicaram um ensaio clínico randomizado, com o objetivo de investigar a efetividade das células estaminais da polpa dentária (CEPD) na regeneração de um defeito experimentalmente criado no periodonto de um modelo canino. A amostra consistiu num grupo de 10 cães, do género masculino, com periodonto saudável. Os parâmetros avaliados foram: formação de cimento, formação óssea alveolar e formação de ligamento periodontal (LP). As CEPD autólogas foram recolhidas de dois pré-molares maxilares extraídos. Realizou-se a análise de citometria de fluxo para caracterização das células isoladas em relação ao seu perfil antigénico na superfície celular usando anticorpos CD146, CD44, CD90, SSEA-4, e anti-macrófagos marcados através de fluorescência. Subsequentemente foi feita a diferenciação celular em células ósseas, cartilagíneas e adiposas. Para testar o potencial de diferenciação celular preconizou-se uma análise de expressão genética através do teste RT-PCR. As células foram então carregadas numa matriz de Bio-Oss® e os conjuntos analisados quantitativamente. 4 semanas após a criação do modelo periodontal, os transplantes foram realizados de forma randomizada. De um lado da mandíbula, o grupo de teste, continha CEPD autólogas e Bio-Oss®, enquanto no lado oposto foi colocado apenas Bio-Oss® como controlo.

A avaliação celular revelou que as culturas primárias derivadas das células estaminais consistiam maioritariamente em fibroblastos, ainda que também tenham sido encontradas, em pequeno número, células claras. Através de citometria de fluxo, verificou-se que a maior parte das células expressava CD90 e CD44 à superfície. Por seu lado, o teste RT-PCR confirmou a presença de genes relacionados com o osso nas células transplantadas, revelou poucos genes para as células adiposas e confirmou a presença de genes cartilagíneos. A avaliação clínica não demonstrou quaisquer sinais de infeção ou recessão gengival em nenhum dos grupos. Supuração, infeção, recessão gengival e exposição radicular não foram observadas.

Histologicamente, as porções transplantadas estavam rodeadas por osso, à exceção de duas amostras do grupo de controlo que se encontravam recobertas por uma cápsula de tecido conjuntivo. Observou-se formação de novo cemento, novo LP e novo osso em todos os casos do grupo de teste. Em contrapartida, no grupo de controlo, embora se tenha observado novo osso em todos os casos, a formação de novo cemento foi observada em 9 defeitos e de novo LP em 8 defeitos. De notar, a maior espessura de cemento regenerado no grupo de teste, bem como o seu recobrimento radicular mais abrangente. Por fim, verificou-se um tecido semelhante à dentina (dentinoide) num caso do grupo de teste. Após análise histomorfométrica, verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos no que respeita à formação óssea, porém, para a formação de cemento e para a formação de ligamento periodontal foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,005$), favorecendo o grupo de teste. Os autores concluem que as CEPD são capazes de promover a regeneração periodontal, formando um excelente complexo quando adicionadas a uma matriz de Bio-Oss®. De acordo com os achados, a implantação deste complexo resultou numa reconstrução significativa de cemento e de LP, além da regeneração de osso alveolar. De qualquer forma, os autores ressaltam que em ensaios próximos é aconselhável utilizarem-se outros grupos de controlo, como auto-enxertos ou outros biomateriais que possam ser carregados com fatores de crescimento. Outros meios de avaliação de tecidos, como os imuno-histoquímicos para identificar antígenos específicos do tecido, a hibridização *in situ* para demonstrar a expressão genética específica do tecido, a tomografia micro-computadorizada para demonstrar a regeneração de tecido mineralizado e as medidas de densidade óssea para analisar a calcificação de tecidos regenerados devem ser consideradas em estudos futuros.

Han et al., em 2013, através de um ensaio de campo, realizado em 36 ratos fêmeas adultas com *follow up* de 7, 14, 21 e 28 dias, procuravam avaliar o potencial regenerativo das células estaminais do ligamento periodontal autólogo (CELP) em defeitos periodontais e estabelecer um parâmetro adequado para quantificar a regeneração tecidular. Os parâmetros utilizados para avaliação do defeito foram (1) a quantificação, em termos percentuais, da área total de tecido mineralizado recém-formado que preenchia a área original do defeito ósseo, sem abranger a zona de LP recém-formada; (2) o comprimento médio do novo osso de ligação, medido a partir da borda do defeito ósseo original (mesial-distal) e expresso sob forma de percentagem relativamente ao comprimento inicial no defeito e, por fim, (3) a quantidade de novo cemento na raiz distal do primeiro molar, medida como o comprimento total de tecido

semelhante a um tecido mineralizado na superfície da raiz desnudada (em milímetros). Foram realizadas 3 terapias diferentes, distribuídas de forma aleatória, da seguinte forma: (1) sem terapia; (2) Gelfoam isolado; (3) Gelfoam + CELP. Para obtenção de CELP, o LP foi removido do terço médio da raiz de molares mandibulares. As células foram isoladas e cultivadas para de seguida serem diferenciadas em células mineralizadas e adiposas. Posteriormente foi realizada a análise por citometria de fluxo para que se pudesse medir a expressão de marcadores de superfície associados a células estaminais mesenquimatosas e não mesenquimatosas. As CELP autólogas foram rotuladas e por fim procedeu-se aos transplantes em modelos experimentais de defeitos de fenestração periodontal criados.

Os resultados mostraram que nos defeitos tratados com as CELP, a percentagem de preenchimento por tecido mineralizado e o comprimento do novo osso de ligação, eram significativamente maiores ($p<0.01$ e $p<0.05$, respetivamente), em relação ao grupo não tratado ou ao grupo de controlo, nos dias 14 e 21. Em relação à formação de novo cemento, o grupo de estudo apresentou, quando avaliado aos 21 dias, maior formação de tecido semelhante ao cemento comparativamente com os outros grupos ($p<0.01$). A investigação mostra que as CELP autólogas são capazes de reparar defeitos periodontais através da formação de osso, LP e tecido tipo cemento.

Tassi *et al.*, em 2017, publicaram uma revisão sistemática com o objetivo de compreender o potencial da regeneração periodontal com CEM em modelos animais. A amostra restringiu-se a estudos pré-clínicos controlados, realizados em animais, utilizando CEM localmente em defeitos periodontais (defeitos intra-ósseos de uma e de três paredes, furcas classe II e III, fenestrações, deiscências, defeitos circunferenciais e supra alveolares). Em alguns desses estudos, após a criação cirúrgica dos defeitos, induziu-se um estado de inflamação crónica através da povoação dos defeitos com bactérias anaeróbias ou a colocação de ligaduras em cervical dos dentes com o objectivo de levar a acumulação de placa bacteriana. Para comparar os resultados da regeneração periodontal foi avaliada a presença de novo osso, de novo cemento e de novo LP. Foram usadas CEM autógenas, alógenas e xenógenas para tratar os defeitos periodontais, provenientes de 9 fontes diferentes: CEM derivado de medula óssea (CEM-MO) (em 9 ensaios); CEM derivadas do ligamento periodontal (CEM-LP) (em 8 ensaios), CEM derivadas de polpa dental, CEM derivadas da margem gengival e células estaminais pluripotentes induzidas por derivação de prepúcio (em 2 estudos cada) e, finalmente, CEM derivada do tecido adiposo, CEM derivada do cemento, CEM folicular

periapical e células periosteais alveolares (em 1 estudo). À exceção de um estudo, todos usaram matrizes.

O uso de CEM-MO para regeneração periodontal produziu resultados conflituosos. Em contraste, o CEM-LP promoveu consistentemente aumento do LP e regeneração do cimento. Finalmente, o uso de CEM juntamente com membranas ou substitutos ósseos, melhorou os resultados regenerativos de defeitos periodontais. As evidências atuais, sugerem que a utilização de CEM pode trazer benefícios na regeneração. No entanto, são necessários estudos futuros que identifiquem quais as fontes mais adequadas para este tipo de terapia regenerativa, bem como o desenvolvimento de abordagens que acarretem resultados mais previsíveis.

Gaubys *et al.*, em 2018, publicaram uma revisão sistemática e meta-análise, com base em 10 ensaios pré-clínicos conduzidos em animais (Jiang *et al.*, 2016, Nuñez *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2008, Jiang *et al.*, 2010, Park *et al.*, 2011, Suaid *et al.*, 2011, Tsumanuma *et al.*, 2011, Suaid *et al.*, 2012, Khorsand *et al.*, 2013, Tobita *et al.*, 2013), para avaliar e quantificar o efeito da terapia com células estaminais sobre a regeneração do complexo periodontal. Os estudos incluídos consideraram defeitos de furca classe II e classe III, defeitos periodontais circunferenciais, defeitos periodontais intra-ósseos de uma e de três paredes. As abordagens terapêuticas estudadas foram agrupadas da seguinte forma (1) CELP + membrana de colagénio *versus* Grupo de controlo, (2) Células estaminais do cimento + esponja de colagénio (EC) *versus* CELP+EC *versus* grupo de controlo, (3) CELP + hidroxiapatite/fosfato tricálcio *versus* grupo de controlo, (4) células estaminais do periósteo alveolar + β - fosfato tricálcio (β -TCP) *versus* grupo de controlo, (5) CEPD *versus* CELP *versus* grupo de controlo (6) CELP+EC *versus* grupo de controlo, (7) CELP + matriz de ácido poligénico (PGA), *versus* Células estaminais do periósteo alveolar + PGA, *versus* grupo de controlo, (8) CELP + esponja + Regeneração tecidual guiada (RTG) *versus* grupo de controlo, (9) CEPD + Bio-Oss® e (10) Células estaminais do tecido adiposo + plasma rico em plaquetas. Os parâmetros avaliados nos diferentes estudos foram a regeneração de LP, de osso alveolar e de cimento.

Relativamente à formação de LP, os resultados foram levemente heterogêneos. Porém todos confirmaram o impacto positivo da terapêutica com células estaminais no LP. Assim a terapia aumentou de forma significativa a regeneração do ligamento ($p < 0,00001$). Na análise de subgrupos, o maior impacto foi no grupo submetido ao transplante com células derivadas do LP, no entanto, estes resultados não mostraram diferenças significativas e todos os subgrupos tiveram 1 a 2 estudos com baixo poder estatístico. Para a regeneração alveolar, os resultados foram também heterogêneos. O efeito positivo desta terapêutica foi verificado em todos os

estudos, todavia, 2 subgrupos não mostraram diferenças quando comparados com o respetivo controlo (Nuñez *et al.*, 2012 e Tsumanuma *et al.*, 2011). De qualquer forma, de um modo geral, os tratamentos foram associados a uma regeneração significativa de osso alveolar ($p=0,0002$), e com diferenças significativas entre os subgrupos, mediante o tipo de células usadas. Quanto à regeneração de cimento, avaliada em 7 dos 10 estudos, os resultados mostraram alta heterogeneidade. No geral, o tratamento melhorou, com significância estatística, a regeneração de cimento ($p<0,00001$). A análise de subgrupos mostrou algumas diferenças entre as terapêuticas, mas pelo baixo poder estatístico não se pode transpor conclusões para um cenário geral.

Em suma, a terapia regenerativa com células estaminais parece ser benéfica para a regeneração do tecido periodontal quando comparada aos grupos controlo, verificando-se a maior influência na regeneração do cimento (SMD 2.25 [95% CI = 1.31 a 3.2]) e a menor influência sobre o osso alveolar (SMD 1.47 [95% CI = 0.7 a 2.25]). Por fim, verificou-se também alguma influência sobre a regeneração do LP, encontrando-se esta com valores entre os de regeneração do cimento e de regeneração do osso alveolar (SMD 1,80 [IC 95% = 1 a 2,59]). Atendendo à heterogeneidade de resultados, os autores alertam para a dificuldade na análise dos subgrupos, salientando que apesar de terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas para a regeneração de osso e de cimento, os resultados podem, no entanto, estar enviesados devido ao pequeno número de estudos incluídos.

Estudos em humanos (ver tabela 2, Anexo 1)

Li *et al.*, em 2016, efetuaram um estudo experimental, em duas pacientes do género feminino, com diagnóstico de lesões periodontal-endodônticas combinadas, com profundidade de sondagem (PS) de 5-6 mm. As pacientes, com 30 e 38 anos, apresentavam 29 e 30 dentes, respetivamente. O principal objetivo foi o isolamento de células estaminais derivadas do tecido pulpar inflamado (CEDTPI) para avaliar a sua viabilidade e efeito na reconstrução dos defeitos intraósseos de cada paciente. Foram avaliados os seguintes parâmetros: índice de placa, índice de hemorragia, profundidade de sondagem, recessão gengival (RG), nível de inserção clínico (NIC) e mobilidade dentária. A monitorização dos vários parâmetros foi feita antes da cirurgia, após o transplante do complexo β - fosfato tricálcico (β -TCP) / CEDTPI e aos 1, 3 e 9 meses. O protocolo utilizado preconizou o isolamento, cultura celular e a introdução a 37°, em cada amostra, de enzimas (colagenase tipo I e dispase II). Primeiramente foi adicionada uma mistura de nutrientes e depois de sêrum bovino. No final desta etapa,

observou-se, após 5 dias, a formação de uma unidade de fibroblastos. Foi feita a contagem celular para perceber a viabilidade das células, que após 1 a 6 dias resultou no aumento do volume nas placas onde estas foram plantadas. A análise do ciclo celular foi realizada quando as células estavam na fase de diferenciação osteogénica. Utilizando uma técnica de citometria de fluxo, as células foram incubadas com anticorpos primários (anticorpos monoclonais CD44, CD90, CD105, CD117, CD45, CD34 e CD271). As células foram então medidas e testadas quimicamente. A diferenciação *in vitro* e os testes RTC-PCR foram úteis para compreender a capacidade destas se diferenciarem em células ósseas, adiposas e cartilagíneas. Foi preparado e avaliado o complexo β -TCP/CEDTPI e realizado o transplante do complexo autólogo nos defeitos intraósseos. Para comparar o comportamento, *ie*, a capacidade de se diferenciarem e proliferarem, das células inflamatórias *versus* normais, foi paralelamente realizado um estudo *in vitro*. Após a recolha de células normais provenientes de dentes decíduos (CEDD), de dentes supranumerários, de terceiros molares ou de dentes com extração indicada por motivos ortodônticos, concluiu-se que, embora tivessem uma prestação inferior, as células inflamatórias poderiam ser usadas.

Os resultados encontrados mostram que as células estaminais derivadas de tecido pulpar inflamado tiveram um efeito regenerativo de novo osso, tendo sido capazes de reparar defeitos periodontais 9 meses após a reconstrução cirúrgica. Embora a taxa de sucesso da cultura celular primária e do estado de crescimento tenha sido ligeiramente inibida (relativamente a células normais), os CEDTPI expressaram níveis comparáveis de marcadores de células estaminais (CD34, CD45, e CD117, CD44, CD90, CD105 e CD27), assim como mantiveram a sua capacidade de multidiferenciação. Tendo em conta os resultados obtidos, os autores concluíram que pode ser desenvolvido um procedimento padrão potencialmente eficaz e seguro para o tratamento periodontal clínico usando CEDTPI autólogas humanas. No estudo presente, as células inflamatórias foram transplantadas com sucesso. A utilização destas células inflamatórias, exige técnicas menos invasivas, mais conservadoras e é mais aceitável aos olhos dos pacientes. A utilização de marcadores confirma a capacidade de diferenciação celular, no entanto, sabe-se que a expressão dos marcadores varia entre espécies, bem como entre órgãos. Com este estudo foram encontradas evidências de melhoria da condição clínica a nível gengival, desde a cor, à dinâmica e à mecânica. Apesar da dificuldade em se conseguir diminuir marcadamente a recessão gengival, verificou-se a diminuição da profundidade de sondagem, a resolução da hemorragia gengival e a melhoria das lesões de furca de grau II para grau I. Em suma, o auto-enxerto de β -TCP/CEDTPI melhorou os sinais e sintomas

clínicos da periodontite. Em nenhum dos casos, os pacientes submetidos a esta terapia demonstraram repercussões negativas. Embora estes resultados sejam promissores, os autores alertam para a necessidade de mais estudos.

Chen et al., em **2016**, realizaram um ensaio clínico randomizado, com *follow-up* de 12 meses, para avaliar a segurança e a viabilidade do uso de CELP autólogo como adjuvante à regeneração tecidual guiada (RTG) com xenoenxerto de origem bovina, no tratamento de defeitos intra-ósseos periodontais. A amostra englobou 30 pacientes, com idades entre os 18 e os 65 anos, representando um total de 41 dentes incluídos. Os dentes selecionados apresentavam defeitos intra-ósseos de 3 mm, com 2 ou 3 paredes, mobilidade de grau 2, ou inferior, e com uma quantidade de gengiva aderida mínima, para a qual os tratamentos existentes de RTG e enxerto ósseo são considerados apropriados. Foram avaliados o nível de inserção clínico, a profundidade de sondagem e a recessão gengival. Os pacientes foram aleatoriamente designados para o grupo de células (RTG e CELP em combinação com Bio-Oss®) ou para o grupo controlo (RTG e Bio-Oss®, sem células estaminais). 21 dentes foram tratados no grupo de controlo e 20 foram submetidos a terapêutica celular recorrendo a CELP autólogo recolhidas de 3^{os} molares previamente extraídos por estarem impactados ou sem função. As células foram isoladas e cultivadas para serem diferenciadas e caracterizadas. Após o tratamento celular em meio de cultura realizada fora do organismo, foram adicionadas partículas de Bio-Oss® à estrutura celular. Por fim, realizou-se o transplante da lâmina de células estaminais com Bio-Oss®.

Os exames radiográficos mostraram preenchimento ósseo significativo em ambos os grupos. A magnitude do aumento da altura óssea aos 3, 6 e 12 meses foi determinada como a diminuição do defeito ósseo em profundidade. Cada grupo apresentou um aumento significativo na altura óssea ao longo do tempo ($p < 0,001$). No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de células e o grupo controlo ($p > 0,05$). Em relação aos parâmetros clínicos periodontais, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para o ganho de NIC ($p = 0,371$), para a PS (vestibular $p = 0,333$; lingual $p = 0,147$) ou para a RG (vestibular $p = 0,728$; lingual $p = 0,915$), entre os grupos de células e de controlo, aos 3 meses ($p > 0,05$). Durante o acompanhamento ao longo de um ano, também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,742$). Os autores concluíram que o uso de CELP autólogas é seguro para o tratamento de defeitos intraósseos periodontais e não produz efeitos adversos significativos. No entanto, mais estudos são necessários.

Vandana *et al.*, em 2017, publicaram um relato de um caso de um paciente com 27 anos, com evidência de periodontite localizada distalmente no 1º molar mandibular. Os autores utilizaram uma abordagem regenerativa celular com intuito de superar as limitações dos tratamentos existentes. O paciente foi seguido durante um ano e o defeito intra-ósseo foi avaliado radiográfica e clinicamente mediante avaliação da profundidade de sondagem, da posição da margem gengival e do nível de inserção clínico. A abordagem terapêutica descrita consistiu na elevação de um retalho mucoperiósteo, de distal do 2º pré-molar mandibular direito até ao 2º molar mandibular direito, estendendo-se 2mm além do defeito. Procedeu-se ao desbridamento completo do defeito e à extração do 3º molar superior direito impactado. Foi utilizado tecido do LP que continha CELP do 3º molar extraído bem como células resultantes de restos de cimento obtidos com a raspagem da raiz do dente extraído. Para a realização do transplante foi utilizada uma esponja de gelatina (abgel) cortada em pedaços (1x1mm) misturada com o tecido autólogo e as raspas de cimento. Depois de transplantado o complexo, foram realizados exames clínicos intervalados, à 1 semana, aos 3 meses, 6 meses e 1 ano pós-operatório.

Após um ano de acompanhamento, os resultados revelaram um ganho de 6 mm no nível de inserção clínico (medido a partir de um ponto de referência fixo), bem como diminuição da profundidade de sondagem. Os autores salientam que a aplicação de células estaminais com a técnica de regeneração periodontal descrita (SAI-PRT) usando CELP pode vir a superar as limitações dos métodos realizados em cultura de células estaminais como sejam o alto custo, a sensibilidade técnica, a perda de capacidades estaminais durante a passagem celular, manipulação genética e potencial de formar tumores. No entanto, reconhecem algumas limitações como a incerteza acerca do número e viabilidade celular após a raspagem dos tecidos. Referem ainda que a falta de rigor científico em relação à evidência histológica e análise *in vitro* da caracterização de células estaminais e potencial osteogénico são pontos fracos do processo. Desta forma, concluíram que a aplicação direta de CELP, embora promissora, carece de validação científica de forma a tornar os resultados válidos.

Ferrarotti *et al.*, em 2018, realizaram um ensaio clínico prospetivo, com *follow-up* de 1 ano, em 29 pacientes (13 homens e 14 mulheres), com idades compreendidas entre os 39 e os 69 anos. O objetivo foi avaliar se as CEPD, colocadas em defeitos intra-ósseos numa estrutura de colagénio, aumentariam os parâmetros clínicos e radiográficos da regeneração periodontal. A amostra resultou num total de 29 defeitos. No grupo de teste, 15 defeitos ósseos (6 maxilares e 9 mandibulares) foram submetidos a uma técnica cirúrgica minimamente invasiva (TCMI)

associada a micro enxertos de polpa dentária num complexo de colagénio; no grupo de controlo, 14 defeitos (8 maxilares e 6 mandibulares) receberam TCMI e esponja de colagénio sem células. Avaliou-se a presença de placa, a presença de hemorragia, a recessão gengival, o nível de inserção clínico e o preenchimento do defeito ósseo. A terapêutica consistiu na elevação de um retalho mínimo, no desbridamento cuidadoso da raiz e na recolha de dados intra-cirúrgicos. Foi realizada a extração de um dente vital (sem função em boca: impactado, mal posicionado ou com indicação de extração), para remoção mecânica da polpa dentária e obtenção de micro enxertos ricos em células estaminais da polpa dentária. Os locais de teste (n=15) foram então preenchidos com micro enxertos plantados numa esponja de colagénio, enquanto no grupo de controlo (n=14) apenas foi colocada a esponja de colagénio. A avaliação dos parâmetros clínicos foi feita no início do estudo, aos 6 meses e ao final de 1 ano, pós-operatório.

Os resultados mostraram alterações significativamente diferentes entre os dois procedimentos ($p \leq 0.03$), com o grupo de teste a revelar melhor desempenho no ganho de inserção clínica (ganho de NIC ≥ 4 mm: 73% *versus* 29%) e redução de profundidade de sondagem (PS residual < 5 mm: 93% *versus* 50%), em ambas as avaliações. Face a estes dados, os autores concluíram que a aplicação de CEPD melhorou significativamente os parâmetros clínicos de regeneração periodontal, 1 ano após o tratamento.

III. DISCUSSÃO

A regeneração completa dos tecidos destruídos por periodontite é, desde sempre, o objetivo mais altruísta do tratamento periodontal. Para que ocorra uma verdadeira regeneração periodontal é essencial que se verifique um selamento epitelial, de forma a evitar a migração das células epiteliais para os defeitos periodontais, a formação de um novo cemento acelular, que deve ser regenerado na superfície da raiz, o restabelecimento da altura de osso alveolar e a inserção, no cemento recém-formado de novas fibras de Sharpey (Honda *et al.*, 2010). Por outro lado, é necessário o recrutamento coordenado de células especializadas para a área a regenerar e a deposição de moléculas de matriz específicas, consistentes com a formação de tecido conjuntivo, mole e duro, o que, em grande parte, é impulsionado por citocinas e fatores de crescimento solúveis (Lin *et al.*, 2008). Lamentavelmente, os procedimentos regenerativos disponíveis na atualidade são, apesar de tudo, considerados menos que ideais. Talvez por isso, o reconhecimento, nos últimos anos, de células estaminais provenientes de tecidos dentários humanos (autorrenováveis, multipotentes, de obtenção relativamente simples e capazes de originar diferentes linhagens celulares) é promissor para o desenvolvimento de novas abordagens, mais eficazes, para a regeneração periodontal e terapia reconstrutiva. O desafio para a engenharia tecidual, neste caso em particular, consiste na utilização de diferentes populações de células estaminais dentárias de forma a replicar os eventos chave no desenvolvimento periodontal e promover uma regeneração sequencial do periodonto (Lin *et al.*, 2008; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2011; Machado, Fernandes e Gomes, 2012).

Desde o ano 2000, quando Gronthos *et al.* isolaram as primeiras células estaminais da polpa dentária humana, já foram, até à data, isoladas e caracterizadas 5 populações de células estaminais dentárias: as originárias da polpa dentária (CEPD), da esfoliação de dentes decíduos (CEDD), da papila apical, do ligamento periodontal (CELP) e do folículo dentário. O fácil acesso, a intervenção (relativamente) mínima necessária para obter as células, além do mais, pouco invasiva e com baixa morbilidade, o seu potencial regenerativo, a capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens de células osteoblásticas, cementoblásticas e fibroblásticas, em particular a ausência de rejeição autoimune e a eficácia (ao estimular a neovascularização e proporcionando uma regeneração tecidual mais rápida) e eficiência da reparação (custo-benefício), constituem as principais vantagens para apoiar tais terapias num futuro próximo (Mohamed *et al.*, 2011; Machado, Fernandes e Gomes, 2012; Khorsand *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Gaubys *et al.*, 2018).

Embora sejam inúmeras as vantagens, alguns aspetos negativos e/ou limitações devem ser considerados aquando da utilização destas populações celulares, nomeadamente a sua disponibilidade, já que nem todos os indivíduos têm dentes indicados para extração, o que limita o acesso ao isolamento de células estaminais de origem dentária. No caso das CEDD, também não é possível prever com exatidão o período de exfoliação dos dentes decíduos, limitando a aplicabilidade de um protocolo de recolha adequado. Para além disto, as condições de cultura, a quantidade de células implantadas, o número de implantações e a via de entrega, necessitam de protocolos otimizados e bem estabelecidos. De salientar também os potenciais problemas relacionados com a biossegurança, uma vez que o risco de transmissão de doenças, vírus, fungos ou priões, potencialmente associados aos protocolos de expansão celular *ex vivo*, podem também limitar a sua aplicabilidade clínica. Por exemplo, a probabilidade de desenvolvimento de um processo cancerígeno (pois a indução da imunossupressão por inibição da proliferação de células T pode conduzir ao crescimento de um possível tumor), obriga ao desenvolvimento e identificação de marcadores celulares para que o rastreio *in vivo* das células transplantadas possa ser adequado e atempadamente realizado. Mais, o custo associado à utilização terapêutica destas células é ainda bastante acentuado (Ferrari *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008). De qualquer forma, os autores dos 8 estudos incluídos neste trabalho, que procuravam compreender o potencial regenerativo das células estaminais quando utilizadas para tratar defeitos periodontais intra-ósseos, foram unânimes em afirmar que a aplicação desta terapêutica é potencialmente segura, com potencial regenerativo e/ou capaz de trazer benefícios a outras terapêuticas regenerativas já utilizadas.

No presente trabalho foram avaliados 4 estudos realizados em animais e 4 estudos em humanos. Relativamente aos primeiros, Khorsand *et al.* (2013) ao avaliarem a utilização de CEPD, demonstraram a capacidade regenerativa destas células e embora não se tivesse verificado uma diferença estatisticamente significativa para a formação de osso, esta diferença estava presente quer na formação de cemento quer na formação de LP ($p < 0,005$) comparativamente ao grupo de controlo. Já no estudo de Han *et al.*, do mesmo ano, são as células progenitoras derivadas do LP autólogo as protagonistas, sendo capazes de manter a hemóstase e portadoras de potencial regenerativo. Neste estudo, notou-se uma diferença significativa entre o grupo tratado com CELP autólogas em relação ao grupo não tratado ou ao grupo de controlo, relativamente à percentagem de preenchimento por tecido mineralizado, formação de novo cemento e o comprimento do novo osso de ligação ($p < 0.01$, $p < 0.01$ e $p < 0.05$, respetivamente). Na revisão sistemática e meta-análise dirigida por Gaubys *et al.*, em

2017, foram avaliados diferentes tipos de células consoante a sua proveniência (células estaminais do cimento, da polpa dentária, do periósteo alveolar, do LP e do tecido adiposo). Quando comparado o potencial de regeneração dos diferentes tecidos, os resultados sugerem que a proveniência das células pode ter alguma influência, tendo-se verificado que determinadas células, de determinados tecidos, são mais eficazes. Porém, não parece seguro extrapolar estes achados dada a grande heterogeneidade de resultados e ao potencial risco de viés originado pelo pequeno número de estudos incluídos. Por fim, na meta-análise de Tassi *et al.*, em 2018, embora as CEM-MO tenham produzido resultados conflituosos, as CEM-LP promoveram consistentemente o aumento do LP e regeneração do cimento e o uso de CEM associadas a membranas ou substitutos ósseos melhorou os resultados regenerativos.

No grupo de estudos em humanos, Li *et al.* (2016) mostraram resultados positivos com um auto-enxerto de β -TCP/ CEDTPI. Em contrapartida, Chen *et al.*, também em 2016, ao usarem CELP autólogas, não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de células e o grupo controlo ($p > 0,05$). No caso clínico publicado por Vandana *et al.*, em 2018, não foi possível a comparação de resultados com um grupo de controlo, no entanto este mostra resultados positivos utilizando CELP numa técnica de regeneração periodontal (SAI-PRT). Por fim, Ferrarotti *et al.* (2018) mostraram resultados a favor da utilização de CEPD ($p \leq 0,03$), com melhores resultados no grupo de teste em termos de ganho de inserção clínica e redução da profundidade de sondagem.

Dado o reduzido número de estudos (com amostras diminutas), não será possível uma comparação justa e transversal entre os estudos incluídos, que demonstre se a proveniência das células estaminais é determinante no processo regenerativo e/ou que possibilite uma extrapolação dos dados para um cenário geral. Deve igualmente ser tido em conta que entre os estudos os protocolos sofrem variações. A ausência de um protocolo universal deve ser avaliada no futuro para reduzir potenciais erros e com vista a obtenção de uma técnica reprodutível que permita eliminar possíveis viés nos resultados atuais. É, portanto, difícil ou no mínimo imprudente, validar e extrapolar globalmente a efetividade desta terapêutica, seja pelo número reduzido de estudos em humanos, seja pelo facto de não haver um procedimento *standard* e protocolado entre os trabalhos publicados, nomeadamente nos procedimentos de recolha e/ou tratamento das células. Embora, de entre as várias publicações, os parâmetros avaliados sejam em regra semelhantes, a forma como são mensurados/avaliados é diferente. Mais, seria igualmente interessante, em estudos futuros, adicionar outros meios de avaliação, mais rigorosos (para além da comum avaliação radiográfica e avaliação clínica da

profundidade de sondagem, do nível de inserção clínico e da quantificação do ganho de tecido gengival), como por exemplo, análises imuno-histoquímicas para identificar antígenos específicos do tecido, hibridização *in situ* para demonstrar a expressão genética específica do tecido, tomografia micro-computadorizada para demonstrar a regeneração de tecido mineralizado e medidas de densidade óssea para analisar a calcificação dos tecidos regenerados, como sugerido por Khorsand e colaboradores, em 2013.

Torna-se evidente que, apesar da investigação em células estaminais de origem dentária ter aumentado exponencialmente, as aplicações terapêuticas têm, contrariamente, progredido de forma mais lenta. Pelo exposto, é ainda difícil prever o impacto que a engenharia tecidual com recurso a células estaminais dentárias terá no futuro. De notar, que esse impacto ultrapassa claramente os limites da Medicina Dentária, havendo investigações a decorrer no sentido de explorar a capacidade das células estaminais dentárias de se diferenciarem em outros tecidos, como o músculo cardíaco (Mohamed *et al.*, 2011). Por tudo isto, mais estudos, *in vitro* e *in vivo* (em modelos animais), são necessários para gerar informação adicional sobre as células estaminais dentárias e a sua aplicação médica e médico-dentária. Uma melhor compreensão acerca da real eficácia terapêutica, sobrevivência celular, integração, funcionalidade e (bio)segurança a longo prazo, é essencial, antes de se poder considerar, em consciência, a utilização das células estaminais na prática clínica diária (Lin *et al.*, 2008; Valponi, Pang e Sharpe, 2010; Mohamed *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2016). Apenas quando ultrapassadas estas questões e (se) uma vez confirmado o potencial regenerativo das células estaminais em estudos pré-clínicos e em modelos animais, fará sentido a realização de estudos multicêntricos, randomizados e controlados, com amostras de tamanho adequado e tempos de *follow-up* alargados, para poder validar e extrapolar a sua aplicabilidade no âmbito da regeneração periodontal.

IV. CONCLUSÕES

A investigação acerca da utilização de células estaminais de origem dentária na regeneração de defeitos periodontais intra-ósseos, apesar de promissora, está ainda uma fase muito embrionária. São, portanto, necessários mais estudos, pré-clínicos, em modelos animais e (mais tarde) em humanos, para poder validar e extrapolar a sua aplicabilidade no âmbito da regeneração periodontal.

V. BIBLIOGRAFIA

Baptista, I. (2005). Contribuição para o estudo da regeneração periodontal. A influência de um derivado das proteínas do esmalte no epitélio gengival – *estudo in vivo*. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra.

Chen, F. M. *et alii*. (2016). Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: A randomized clinical trial. *Stem Cell Research & Therapy*, Volume 7, Nº1, pp. 1-11.

Ferrari, M. *et alii*. (2007). Adult Stem Cells: Perspectives for Therapeutic Applications, *Veterinary Research Communications*, Volume 31, Nº1, pp. 1-8.

Ferrarotti, F. *et alii*. (2018). Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, Volume 45, Nº7, pp. 841-850.

Gaubys, A. Papeckys, V. e Pranskunas, M. (2018). Use of Autologous Stem Cells for the Regeneration of Periodontal Defects in Animal Studies: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, Volume 9, Nº2, pp. 1-17.

Gronthos, S. *et alii*. (2000). Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) In Vitro and In Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Volume 87, Nº25, pp. 13625-13630.

Han, J. *et alii*. (2014). Assessment of the regenerative potential of allogeneic periodontal ligament stem cells in a rodent periodontal defect model. *Journal of Periodontal Research*, Volume 49, Nº3, pp. 333-345.

Heden, G. e Wennström, L. (2006). Five-year follow-up of regenerative periodontal therapy with enamel matrix derivative at sites with angular bone defects. *Journal of Periodontology*, Volume 77, Nº2, pp. 295-301.

Honda, M. *et alii*. (2010). Dental Follicle Stem Cells and Tissue Engineering. *Journal of Oral Science*, Volume 52, Nº4, pp. 541-552.

Khorsand, A. *et alii.* (2013). Autologous Dental Pulp Stem Cells in Regeneration of Defect Created in Canine Periodontal Tissue. *Journal of Oral Implantology*, Volume 39, Nº4, pp. 433-443.

Li, Y. *et alii.* (2016). Repair of human periodontal bone defects by autologous grafting stem cells derived from inflammatory dental pulp tissues. *Stem Cell Research and Therapy*, Volume 7, Nº1, pp. 1-9.

Lin, N-H. *et alii.* (2008). Stem cells and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, Volume 53, pp. 108-121.

Machado, E. Fernandes, M. e Gomes, P. (2012). Dental Stem Cells for Craniofacial Tissue Engineering. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, Volume 113, Nº6, pp.728-733.

Mohamed, J. *et alii.* (2011). Dental Stem Cells and their potential role in Regenerative Medicine. *Journal of Medical Sciences*, Volume 4, Nº2, pp. 53-61.

Rodríguez-Lozano, F. *et alii.* (2011). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues. *International Endodontic Journal*, Volume 44, pp. 800-806.

Tassi, S. A. *et alii.* (2017). Efficacy of stem cells on periodontal regeneration: Systematic review of pre-clinical studies. *Journal of Periodontal Research*, Volume 52, Nº5, pp. 793-812.

Vandana, K. L. *et alii.* (2017). Autologous periodontal stem cell assistance in periodontal regeneration technique (SAI-PRT) in the treatment of periodontal intrabony defects: A case report with one-year follow-up. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, Volume 11, Nº2, pp. 123-126.

Volponi, A. Pang, Y. e Sharpe, P. (2010). Stem Cell-Based Biological Tooth Repair and Regeneration. *Trends in Cell Biology*, Volume 20, Nº12, pp. 715-722.

VI. ANEXOS

VI.1 TABELA 1: ESTUDOS EM ANIMAIS

Autor/ Data	Tipo de estudo:	Amostra:	Objetivo:	Parâmetros avaliados:	Tipo de tratamento:	Resultados:	Conclusões:
Khorsand <i>et al.</i> 2013	Ensaio clínico randomizado	<p>Dez cães do sexo masculino, com periodonto saudável (1-2 anos, pesando 14-22 kg) foram obtidos do Instituto de Ciência Animal de Teerã 2 semanas antes do início da investigação.</p> <p>Foram extraídos 2 Pré-molares maxilares para a recolha celular.</p> <p>Foram criados defeitos periodontais de 3 paredes (bilaterais em mesial do 1 pré-molar mandibular) com periodontite induzida.</p>	Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos das células estaminais da polpa dentária (CEPD) na regeneração de um defeito experimentalmente criado no periodonto de um modelo canino.	Formação de cimento, formação óssea alveolar, formação de ligamento periodontal.	<p>Foram colhidas CEPD autólogas derivadas de Pré-molares maxilares.</p> <p>A análise de citometria de fluxo foi utilizada para caracterização das células isoladas em relação ao seu perfil antigénico na superfície celular. Sendo que se usaram anticorpos (CD146, CD44, CD90, SSEA-4) e anti-macrófagos marcados através da fluorescência.</p> <p>De seguida foi realizada a diferenciação celular. (para formação de células ósseas, adiposas e cartilagíneas.) Esta foi submetida a uma análise de expressão genética (RT-PCR)</p> <p>Após tratamento celular, avaliação, diferenciação celular, foi utilizado bio osso como matriz para as células e aqui se prosseguiu com o carregamento celular, tendo também este sido avaliado em termos quantitativos.</p> <p>Quatro semanas após a criação do modelo de periodontite, implantaram-se de forma randomizada CEPD autólogas combinados com Bio-Oss® de um lado como grupo de teste. Por outro lado, apenas o Bio-Oss® foi implantado como controle.</p>	<p>Avaliação celular:</p> <p>Maioritariamente as culturas primárias derivadas das células estaminais consistiam em fibroblastos, no entanto havia um pequeno número de células estaminais claras entre estes fibroblastos. As culturas primárias chegaram a uma confluência em 10 dias enquanto as subculturas, estas mais pequenas chegaram a uma confluência numa semana.</p> <p>Citometria de fluxo:</p> <p>A maior parte das células expressava CD90 e CD44 à superfície.</p> <p>O teste RT-PCR:</p> <p>Revelou genes relacionados com osso, como osteopontin e ColIA1.</p> <p>Revelou poucas células adiposas.</p> <p>Confirmou a presença de condrogénese.</p> <p>Histologicamente, em todos 10 defeitos, a regeneração óssea e periodontal foi observada. Nos grupos controle, embora tenhamos observado a degeneração dos defeitos ósseos, a formação do cimento foi observada em 9 defeitos e o ligamento foi visto em 8 defeitos.</p> <p>Análises histomorfométricas mostraram que a quantidade de cimento regenerado e ligamento nos grupos de teste foi maior do que os grupos controle.</p> <p>Supuração, infeção, recessão gengival e exposição radicular não foram observadas. Não</p>	<p>Esta investigação mostra que as CEPD são capazes de promover a regeneração periodontal. Juntamente com uma matriz de Bio-Oss®, os CEPD seriam um excelente bio complexo.</p> <p>De acordo com os achados, o implante de CEPD combinado com grânulos de Bio-Oss® resultou numa reconstrução significativa de cimento e ligamento, além da regeneração do osso alveolar.</p>

						<p>houve diferença entre os grupos.</p> <p>Não houve diferença significativa na formação óssea entre os grupos teste e controle. A quantidade de formação óssea nestes grupos foi de $3,60 \pm 1,06$ mm nos grupos teste e $3,10 \pm 0,82$ mm nos grupos controle. Nova formação de cemento nos grupos de teste foi de $3,83 \pm 1,32$ mm em comparação com $2,42 \pm 1,40$ mm nos grupos de controle, que foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Em relação à formação de ligamento periodontal (LP), o valor médio foi de $3,30 \pm 0,12$ mm para os grupos teste e $1,77 \pm 1,27$ mm para os grupos controle ($P < 0,05$).</p>	
Han <i>et al.</i> 2013	Estudo clínico experimental, ensaio de campo	Trinta e seis ratos fêmeas adultas. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados unilateralmente no lado direito das mandíbulas de todos.	O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial regenerativo de células estaminais do ligamento periodontal autólogo (CELP) num defeito periodontal em ratos e identificar um parâmetro adequado para avaliação quantitativa da regeneração tecidual.	(1) quantificação, em percentagem, da área total de tecido mineralizado recém-formado que preenchia a área original do defeito ósseo, sem abranger a zona de LP recém-formada; (2) o comprimento médio do novo osso de ligação, medido a partir da borda do defeito ósseo original (mesial-distal) e expresso sob forma de percentagem relativamente ao comprimento inicial no defeito, (3) a quantidade de novo cemento na raiz distal do primeiro molar, medida como o comprimento total de tecido semelhante a um tecido mineralizado na superfície da raiz desnudada (mm).	Os defeitos cirúrgicos foram atribuídos a uma das três terapias diferentes: (1) Não tratada; (2) Gelfoam isolado; (3) Gelfoam + CELP. Isolamento e cultura de CELP de ratos, seguidas de diferenciação celular Posteriormente foi realizada a análise por citometria de fluxo, rotulou-se CELP autólogas com 5'-bromo-2'-desoxiuridina Foi realizado um modelo experimental de defeito de fenestração periodontal no rato Preparou-se o tecido histológico, posteriormente colorado com tetracromo modificado De seguida procedeu-se à localização de CELP marcadas com BrdU Por fim, avaliação histomorfométrica terminando nos métodos estatísticos.	<p>Defeitos tratados com CELP mostraram significativamente maior percentagem de preenchimento ósseo e comprimento de nova ponte óssea em comparação com o grupo não tratado ou o grupo tratado com Gelfoam isolado nos dias 14 e 21.</p> <p>Similarmente, uma diferença estatisticamente significativa foi alcançada nas amostras recuperadas no dia 21 para análise de regeneração de estruturas do tipo cemento / ligamento periodontal (LP).</p>	<p>A presente investigação mostra que as CELP alógenicas possuem uma capacidade marcada para reparar defeitos periodontais através da formação de osso, LP e tecido tipo cemento in vivo.</p> <p>Os resultados sugerem que os períodos de tratamento de 14 e 21 dias são ótimos para avaliação quantitativa da regeneração periodontal dentro do modelo de fenestração de defeitos, nos roedores, utilizados no presente estudo.</p>

Tassi <i>et al.</i> 2017	Revisão sistemática de estudos pré-clínicos	Os defeitos periodontais foram criados cirurgicamente em todos os estudos. Diferenças na morfologia dos defeitos foram identificadas entre os estudos que avaliaram: defeitos intra-ósseos de três paredes, defeitos intra-ósseos de uma parede única, furcas classe III e classe II, fenestrações, deiscências, defeitos circunferenciais e supra alveolares. Em alguns desses estudos, após a criação de defeitos cirúrgicos, os defeitos foram preenchidos com bactérias anaeróbias ou materiais de impressão para induzir a inflamação crônica. Em outros, as ligaduras foram fixadas no aspecto cervical dos dentes afetados para permitir a acumulação de placa após a criação do defeito cirúrgico.	Avaliar o potencial regenerativo periodontal de células estaminais mesenquimatosas (CEM) em modelos animais.	Novo osso, Cimento e LP	As CEM autógenas, alógenas e xenógenas foram usadas para tratar defeitos periodontais. Estes englobaram nove tipos / fontes diferentes de CEM. Entre estes, CEM derivado de medula óssea (CEM-MO) foram utilizados em nove ensaios. CEM-LP foram utilizados em oito estudos. CEM derivadas de polpa dental (CEM-P), CEM derivada de margem gengival e células estaminais pluripotentes induzidas por derivação de prepúcio (CEPP) foram usadas em dois estudos cada. Finalmente, CEM derivada do tecido adiposo (CEM-TA), CEM derivada do cimento, CEM folicular periapical e células do periosteio alveolar foram usadas num estudo. Com exceção de um estudo, todos os estudos usaram matrizes.	Na maioria dos estudos, o implante local de CEM não foi associado a efeitos adversos. O uso de CEM derivada da medula óssea para regeneração periodontal produziu resultados conflitantes. Em contraste, o CEM-LP promoveu consistentemente aumento do LP e regeneração do cimento. Finalmente, o uso adjunto de CEM melhorou os resultados regenerativos de defeitos periodontais tratados com membranas ou substitutos ósseos.	Apesar da qualidade das evidências existentes, os dados atuais indicam que as CEM podem fornecer efeitos benéficos na regeneração periodontal. Estudos futuros precisam de identificar perfis fenotípicos de populações CEM altamente regenerativas.
Gaubys <i>et al.</i> 2018	Uma Revisão Sistemática e uma Meta-Análise	Defeito periodontal de 3 paredes. Defeito de furca classe III. Defeito periodontal circunferencial.	Avaliar os ensaios pré-clínicos em animais e quantificar o tamanho do efeito que a terapia de células estaminais tem sobre a regeneração do	Regeneração do ligamento Periodontal. Regeneração do osso alveolar. Regeneração do cimento.	(1) CELP + membrana de colagénio <i>versus</i> Grupo de controlo, (2) Células estaminais do cimento + esponja de colagénio (EC) <i>versus</i> CELP+EC <i>versus</i> grupo de controlo, (3) CELP + hidroxiapatite/fosfato tricálcio <i>versus</i> grupo de controlo, (4) células estaminais do periosteio alveolar + β-	A terapia regenerativa de células estaminais teve uma diferença estatisticamente significativa para a regeneração do tecido periodontal quando comparada aos grupos controle. Essa terapia pareceu ter a maior influência na regeneração do cimento (SMD 2.25 [95% CI = 1.31 a 3.2]) e a menor influência foi feita no osso alveolar (SMD 1.47	A terapia regenerativa de células estaminais fez diferença para a regeneração do tecido periodontal quando comparada

Regeneração Periodontal de defeitos intra-ósseos com células estaminais de origem dentária

		<p>Defeito de furca de classe II.</p> <p>Defeito periodontal de uma parede única.</p>	complexo de tecido periodontal.		<p>fosfato tricálcio (β-TCP) <i>versus</i> grupo de controlo, (5) CEPD <i>versus</i> CELP <i>versus</i> grupo de controlo (6) CELP+EC <i>versus</i> grupo de controlo, (7) CELP + matriz de ácido poligénico (PGA), <i>versus</i> Células estaminais do perioste alveolar + PGA, <i>versus</i> grupo de controlo, (8) CELP + esponja + Regeneração tecidual guiada (RTG) <i>versus</i> grupo de controlo, (9) CEPD + Bio-Oss® e (10) Células estaminais do tecido adiposo + plasma rico em plaquetas.</p>	<p>[95% CI = 0.7 a 2.25]) o efeito o tamanho da regeneração do ligamento periodontal foi (SMD 1,80 [IC 95% = 1 a 2,59]). Os dados do estudo pareciam ser altamente heterogêneos nos resultados de regeneração óssea e cimento alveolar. Análises de subgrupos não explicaram a possível causa dessa heterogeneidade. Análises de subgrupos mostraram uma diferença estatisticamente significativa nos grupos de regeneração de osso e cimento alveolar com base na duração do tratamento. No entanto, este resultado pode ser enviesado devido a um pequeno número de estudos (1 - 2 estudos) agrupados nas metanálises do último subgrupo.</p>	<p>aos grupos controle.</p> <p>Tal terapia pareceu ter a maior influência na regeneração do cimento.</p> <p>Os dados do estudo pareciam ser altamente heterogêneos em ambos os resultados de regeneração óssea cimento e alveolar.</p> <p>Análises de subgrupos mostraram uma diferença nos grupos de regeneração de osso e cimento alveolar com base na duração do tratamento. No entanto, este resultado pode ser enviesado.</p>
--	--	---	---------------------------------	--	--	---	--

LEGENDA: β -TCP: β - fosfato tricálcico; CELP: células estaminais do ligamento periodontal; CEM: células estaminais mesenquimatosas; CEM-LP: células estaminais mesenquimatosas derivadas do ligamento periodontal; CEM-MO: células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea; CEPD: células estaminais da polpa dentária; EC: esponja de colagénio; LP: ligamento periodontal; NIC: nível de inserção clínico; PGA: matriz de ácido poligénico; PS: profundidade de sondagem; RG: recessão gengival; RTG: regeneração tecidual guiada.

VI.2 TABELA 2: ESTUDOS EM HUMANOS

Autor/ Data:	Tipo de estudo:	Amostra:	Objetivo:	Parâmetros avaliados:	Tipo de tratamento:	Resultados:	Conclusões:
Li <i>et al.</i> 2016	Estudo experimental, ensaio de campo	Duas pacientes do sexo feminino com diagnóstico de lesões periodontal-endodônticas combinadas com profundidade de bolsa de 5 a 6 mm. Paciente número 1 com 30 anos e 29 dentes; Paciente número 2, com 38 anos e 30 dentes.	Este teste piloto pretende isolar células estaminais derivadas de tecido pulpar inflamado, de dois pacientes e avaliar a viabilidade e o efeito da reconstrução de defeitos intraósseos em cada paciente.	O índice de placa (IP), índice de hemorragia (IH), profundidade de sondagem (PS), recessão gengival (RG), nível clínico de inserção (NIC) e mobilidade dentária foram registrados antes da cirurgia e pós transplante do complexo das células estaminais derivadas de tecido pulpar inflamado / β -TCP 1 a 9 meses.	Foram utilizadas células de tecido pulpar inflamado como substrato. As células foram isoladas e cultivadas. Foram submetidas a processos de diferenciação (osteogênese) e de citometria de fluxo. Posteriormente foi testada a sua viabilidade. As células foram medidas e testadas quimicamente. Foi preparado e avaliado o complexo B-TPC / CEDTPI. Por fim foi realizado o transplante autólogo deste complexo. Com monitorização no 1,3 e 9 mês. Como meio de comparação relativamente ao comportamento (capacidade de se diferenciarem e proliferarem) das células inflamatórias VS normais, foi realizado um estudo in vitro após a recolha de células normais de dentes supranumerários ou terceiros molares ou necessidades ortodônticas, e células de dentes decíduos.	As células estaminais derivadas de tecido pulpar inflamado, tiveram um efeito regenerativo de novo osso, tendo sido capazes de reparar defeitos periodontais 9 meses após a reconstrução cirúrgica. Embora a taxa de sucesso da cultura celular primária e do estado de crescimento tenha sido ligeiramente inibida (relativamente a células normais), os CEDTPI expressaram níveis comparáveis de marcadores de células estaminais, assim como mantiveram a sua capacidade de multidiferenciação.	Foi desenvolvido um procedimento padrão que é potencialmente eficaz e seguro para o tratamento periodontal clínico usando CEDTPI autólogas humanas.
Chen <i>et al.</i> 2016	Ensaio clínico randomizado	Um total de 30 pacientes periodontais de idades compreendidas entre os 18 e 65 anos (48 dentes com defeitos intra-ósseos) após distribuição aleatória, 21 dentes foram tratados no grupo de controle e 20 foram tratados com células. Todos os pacientes receberam cirurgia e avaliação	Este estudo avaliou a segurança e a viabilidade do uso de células estaminais do ligamento periodontal autólogo (CELP) como adjuvante de materiais de	Nível de inserção clínico (NIC). Profundidade de sondagem (PS). Recessão gengival (RG).	Foi realizado um estudo onde se usaram CELP autólogas em combinação com materiais minerais ósseos derivados de bovinos para tratar defeitos intra-ósseos periodontais. Os pacientes inscritos foram aleatoriamente designados para o grupo de células (tratamento com folhas RTG e CELP em combinação com Bio-Oss®) ou o grupo controle (tratamento com RTG e Bio-Oss® sem células estaminais). Para o grupo de células foram extraídos	Os exames radiográficos mostraram preenchimento ósseo significativo em ambos os grupos. A magnitude do aumento da altura do osso alveolar aos 3, 6 e 12 meses foi determinada como a diminuição do defeito ósseo em profundidade. Cada grupo apresentou um aumento significativo na altura do osso alveolar ao longo do tempo ($p < 0,001$). No entanto, não foram	Este estudo demonstra que o uso de CELP autólogas para tratar defeitos intraósseos periodontais é seguro e não produz efeitos adversos significativos. A eficácia da terapia periodontal baseada em células requer maior validação por estudos multicêntricos, randomizados e controlados, com um aumento do tamanho da amostra.

		clínica. Defeitos intra-ósseos verticais de 2 ou 3 paredes e 3 mm de profundidade a partir do topo do osso alveolar remanescente da radiografia e dos parâmetros clínicos periodontais. Mobilidade de Grau 2 ou inferior para o dente sob investigação e com uma largura da gengiva aderida para a qual os tratamentos existentes de RTG e implante de enxerto ósseo são considerados apropriados.	regeneração tecidual guiada (RGT) para o tratamento de defeitos intra-ósseos periodontais.		os 3 molares impactados ou sem função. Seguidamente as células foram isoladas e cultivadas para serem diferenciadas e caracterizadas. Após o tratamento celular numa cultura ex vivo, foram adicionadas partículas de Bio-Oss® à estrutura celular. (Mediante o tamanho do defeito, o número de células era tanto maior quanto o defeito.) Por fim, realizou-se o transplante da folha de células estaminais com Bio-Oss®.	encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de células e o grupo controle ($p>0,05$). Em relação aos parâmetros clínicos periodontais, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para o aumento de NIC ($p=0,371$), PS (Bucal $p=0,333$; lingual $P=0,147$) ou RG (Bucal $P=728$; Lingual $P=0,915$) entre os grupos de Células e Controle aos 3 meses de pós-operatório ($p>0,05$). Um acompanhamento ao longo de um ano, também não revelou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de controle e o grupo a ser testado ($P=0,742$).	
Vandana <i>et al.</i> 2017	Relato de caso	Paciente de 27 anos, com evidência de doença periodontal localizada distalmente no 1 molar mandibular. Foi usado o ligamento periodontal de um dente do siso impactado extraído para restaurar o defeito periodontal de outro molar do mesmo paciente.	A pesquisa é focada em novas abordagens baseadas em células para regeneração periodontal para superar as limitações do tratamento existente.	Defeitos intra-ósseos através de rx. Profundidade de sondagem (PS) posição marginal da gengiva, nível de inserção clínico (NIC), quando avaliado por um período de 1 ano.	Foi levantado um retalho mucoperiosteal distalmente do segundo pré-molar mandibular direito para os segundos molares mandibulares direitos, dois milímetros além do defeito. De seguida, procedeu-se ao desbridamento completo do defeito Seguiu-se com a extração do terceiro molar superior direito impactado. Os tecidos usados aderentes à raiz do terceiro molar possuíam CELP. Foram também usados restos de cimento obtidos durante a raspagem da raiz do dente extraído. Abgel (esponja de gelatina), foi cortado em pequenos pedaços (1×1 mm) e misturado com o tecido de transplante autólogo mais as raspagens de cimento. Foi feito o transplante deste complexo para a zona do defeito. Instruções pós-operatórias foram dadas e as suturas foram removidas após 10 dias. O exame clínico foi realizado no início e em intervalos de uma semana, três meses, seis meses e um ano de pós-operatório	Um ano de acompanhamento revelou 6 mm de ganho no nível de inserção medido a partir de um ponto de referência fixo (stent) com uma mudança insignificante na posição marginal gengival, bem como diminuição da profundidade de sondagem.	A aplicação de células estaminais na Técnica de Regeneração Periodontal (SAI-PRT) usando CELP superou as limitações e preocupações dos métodos ex-vivo de cultura de células estaminais como: alto custo, sensibilidade técnica, perda de capacidades estaminais durante a passagem celular, manipulação genética e potencial tumoral. A viabilidade clínica, o sucesso e a eficácia de custos em relação às técnicas atualmente disponíveis são encorajadores. As células estaminais do ligamento periodontal foram cultivadas (ex-vivo) e transplantadas, o que induziu uma melhora significativa da doença periodontal, sugerindo que o transplante CELP pode ser uma alternativa eficaz e

Regeneração Periodontal de defeitos intra-ósseos com células estaminais de origem dentária

							segura para o tratamento da periodontite.
Ferrarotti <i>et al.</i> 2018	Ensaio clínico controlado randomizado.	29 Pacientes com periodontite crônica, apresentando um defeito intra-ósseo profundo e exigindo a extração de um dente vital. 29 pacientes (13 Masculinos e 14 femininos), de 39 a 69 anos (idade média de 50,7 ± 8,5 anos). Quinze defeitos ósseos (6 maxilares e 9 mandibulares) receberam TCMi e micro enxertos de polpa dentária / complexo de colagénio, enquanto 14 (8 maxilares e 6 mandibulares) TCMi e esponja de colagénio sem células.	O objetivo deste estudo foi avaliar se as células estaminais da polpa dentária (CEPD) colocadas em defeitos intra-ósseos numa estrutura de colagénio aumentariam os parâmetros clínicos e radiográficos da regeneração periodontal.	Presença de placa (PB), presença de sangramento (IH), recessão gengival (RG), nível de inserção clínico (NIC) e preenchimento de defeito ósseo.	A polpa dentária do dente extraído foi mecanicamente dissociada para obtenção de micro enxertos ricos em CELP autólogas. Os locais de teste (n = 15) foram preenchidos com micro enxertos semeados numa esponja de colagénio, enquanto os locais de controlo (n = 14) apenas com esponja de colagénio. Parâmetros clínicos e radiográficos foram registados no início do estudo, 6 e 12 meses de pós-operatório.	Os locais de teste exibiram significativamente maior redução na profundidade de sondagem (PS) (4,9 mm versus 3,4 mm), ganho no nível de inserção clínico (4,5 versus 2,9 mm) e preenchimento do defeito ósseo (3,9 versus 1,6 mm) do que nos controles. Além disso, PS residual <5 mm (93% versus 50%) e ganho de NIC ≥ 4 mm (73% versus 29%) foram significativamente mais frequentes no grupo teste.	A aplicação de CELP melhorou significativamente os parâmetros clínicos de regeneração periodontal 1 ano após o tratamento.

LEGENDA : **β-TCP:** β- fosfato tricálcico; **CEDTPI:** células estaminais dentárias de tecido pulpar inflamado; **CELP:** células estaminais do ligamento periodontal; **CEPD:** células estaminais da polpa dentária; **IH:** índice de hemorragia; **LP:** ligamento periodontal; **NIC:** nível de inserção clínico; **PB:** Placa bacteriana; **PS:** profundidade de sondagem; **RG:** recessão gengival; **RTG:** regeneração tecidual guiada; **SAI-PRT:** técnica de intervenção celular na regeneração periodontal; **TCMI:** técnica cirúrgica minimamente invasiva.